

19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 676 059

21) N° d'enregistrement national : 91 05403

51) Int Cl⁵ : C 07 K 5/08, 5/10, 7/64, 1/06; A 61 K 37/64

22) *gpc*

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22) Date de dépôt : 02.05.91.

30) Priorité :

43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 06.11.92 Bulletin 92/45.

56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

71) Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE Etablissement de Caractère Scientifique, Technique et Industriel — FR.

72) Inventeur(s) : Dive Vincent, Toma Flavio et Yiotakis Athanasios.

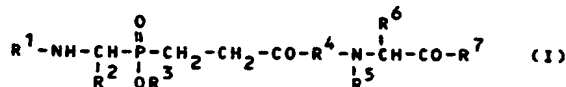
73) Titulaire(s) :

74) Mandataire : Brevatome.

54) Nouveaux dérivés de peptides utilisables comme inhibiteurs de collagénases bactériennes.

57) L'invention concerne de nouveaux dérivés de peptides, utilisables comme inhibiteurs des collagénases bactériennes.

Ces dérivés répondent à la formule:



dans laquelle R¹ est un atome d'hydrogène, un groupe bloquant ou un radical dérivé d'un aminoacide ou d'un peptide éventuellement protégé par un groupe bloquant, R² est la chaîne latérale d'un α-aminoacide, R³ est H, un métal, un groupe alkyle ou benzyle, R⁴ est dérivé de la proline, de l'hydroxyproline, de la thiazolidine ou de la déshydroxyproline, R⁵ est H ou un alkyle, R⁶ est la chaîne latérale d'un aminoacide, et R⁷ est OR⁸ avec R⁸ étant H, un métal, alkyle ou benzyle, ou dans laquelle R¹ et R⁷ forment ensemble un radical bivalent dérivé d'un aminoacide ou d'un peptide.

Les dérivés dans lesquels R³ est un métal ou l'hydrogène sont utilisables comme inhibiteurs des collagénases bactériennes.

FR 2 676 059 - A1



Nouveaux dérivés de peptides utilisables comme inhibiteurs de collagénases bactériennes.

5 La présente invention a pour objet de nouveaux dérivés de peptides, utilisables comme inhibiteurs des collagénases bactériennes qui appartiennent à la classe des métalloprotéases à zinc.

De façon plus précise, elle concerne des dérivés de polypeptides possédant un groupement
10 chélatant phosphinique PO_2-CH_2 susceptible d'interagir fortement avec l'atome de zinc du site actif de ces collagénases.

Le collagène est un composant majoritaire de la matrice extracellulaire des organismes eucaryotes pluricellulaires. Ainsi, il est le constituant
15 principal de la peau, des tendons, des os, des cartilages et des tissus, et représente environ 40% de toutes les protéines du corps humain.

Bien que la molécule de collagène soit
20 très résistante à l'action de la plupart des protéases, elle peut être néanmoins dégradée par des protéases qui lui sont spécifiques, les collagénases.

Deux classes distinctes de collagénases ont été identifiées à ce jour et sont caractérisées
25 par la spécificité des coupures qu'elles opèrent dans la molécule de collagène. La première classe de collagénases est constituée par les collagénases d'organismes supérieurs qui hydrolysent les liaisons peptidiques contenant le doublet Gly-Ile ou Gly-Leu
30 alors que la deuxième classe est constituée par les collagénases bactériennes qui hydrolysent systématiquement toutes les liaisons peptidiques comportant la séquence X-Gly et dégradent en général toute la molécule de collagène.

Les collagénases bactériennes appartiennent à la classe des métalloprotéases à zinc et l'existence d'un atome de zinc dans leur site catalytique qui est impliqué directement dans la réaction d'hydrolyse de la liaison peptidique des substrats, rend possible le développement d'inhibiteurs compétitifs de ces enzymes. Ces inhibiteurs qui peuvent être des dérivés de peptides, comportent une partie peptidique dont la fonction est d'engager des interactions spécifiques avec les sous-sites de liaison de l'enzyme, et un groupement chélatant susceptible d'interagir fortement avec l'atome de zinc du site actif.

Ce modèle d'interaction enzyme-substrat, propre à la famille des protéases à zinc, a permis récemment la mise au point de puissants inhibiteurs présentant des propriétés pharmacologiques intéressantes. Parmi ceux-ci, on peut citer les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et les inhibiteurs des enképhalinases. Toutefois, ces composés sont incapables d'inhiber les collagénases bactériennes. Ceci s'explique par le fait que chacune de ces trois protéases à zinc (enképhalinase, enzyme de conversion, collagénase bactérienne) possède une spécificité différente.

Dans le cas des collagénases bactériennes, des travaux récents ont montré qu'il était possible, d'après les hypothèses développées ci-dessus, de produire aussi pour cette classe de protéases des inhibiteurs pseudo-peptidiques comportant un groupement chélatant thiol, cétone ou phosphoramide.

Ainsi, Yotakis et al dans Eur. J. Biochem, vol 160, p. 413-418 (1986) et dans Eur. J. Biochem., vol. 172, p. 761-766, (1988), ont montré que les

composés HS-CH₂-CH₂-CO-Pro -Arg et HS-CH₂-CH₂-CO-Pro-Har inhibaient les collagénases produites par *Achromobacter iophagus* et par *Clostridium histolyticum*, les constantes d'inhibition K_i obtenues étant de 400.10⁻⁹M et de 210.10⁻⁹M.

Galardy et al dans *Biochemistry*, vol. 22, n° 19, p. 4556-4561, (1983) et dans US-A-4 558 034 ont montré que des di et tripeptides comportant un groupement phosphonyle inhibaient la collagénase de *clostridium histolyticum*. Dans ce cas, pour le meilleur composé isoamyl-P₀₂Gly-Pro-Ala, la constante d'inhibition K_i est de 20.10⁻⁶M.

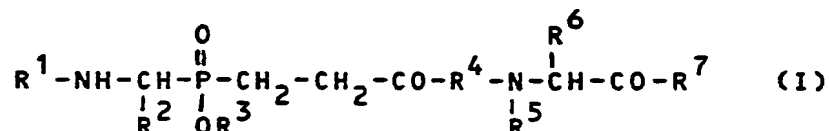
Mookhtiar et al dans *Biochemistry*, vol. 27, p. 4299-4304 (1988) ont montré que des dérivés de peptides comportant une fonction cétone pouvaient inhiber les collagénases de *Clostridium histolyticum*. Dans ce cas, la constante d'inhibition K_i est de 1.10⁻⁶M pour le meilleur composé (cinnamoyl - Leuk-Gly-Pro-Arg).

Ainsi, aucun des inhibiteurs connus ne conduit à des constantes d'inhibition de l'ordre de la nanomole.

Aussi, des recherches ont été poursuivies pour trouver d'autres inhibiteurs plus actifs.

La présente invention a précisément pour objet de nouveaux dérivés de peptides qui sont des inhibiteurs des collagénases bactériennes plus puissants et plus sélectifs.

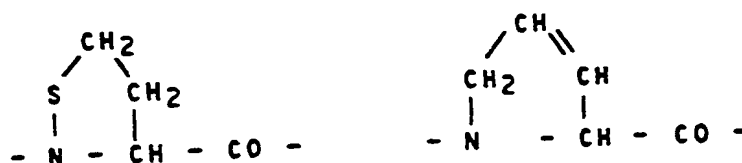
Selon l'invention, ces dérivés de peptides répondent à la formule :



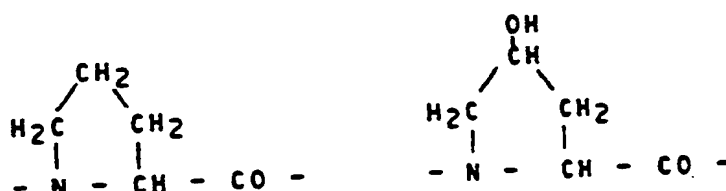
dans laquelle

- R¹ représente un atome d'hydrogène, un groupe capable de bloquer la terminaison N d'un alpha-aminoacide, ou un radical dérivé d'un alpha-aminoacide ou d'un peptide rattaché à NH par sa terminaison CO et comportant sur sa terminaison N un atome d'hydrogène ou un groupe capable de bloquer la terminaison N d'un alpha-aminoacide,
- R² est la chaîne latérale d'un alpha-aminoacide,
- 10 - R³ est un atome d'hydrogène, un atome de métal, un groupe alkyle en C₁ à C₅ ou un groupe benzyle,
- R⁴ est un radical bivalent dérivé d'un alpha-aminoacide choisi parmi la proline, l'hydroxyproline, la thiazolidine et la déshydroproline, de formule :

15



20



- 25 relié à CO par son atome d'azote,
- R⁵ est un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle en C₁ à C₄,
- R⁶ est un groupe alkyle en C₁ à C₅ ou la chaîne latérale d'un alpha-aminoacide, et
- 30 - R⁷ représente OR⁸ avec R⁸ représentant un atome d'hydrogène, un atome de métal, un groupe alkyle en C₁ à C₅ ou un groupe benzyle,
- ou dans laquelle soit R¹ et R⁷, soit R¹ et R⁶, forment ensemble un radical bivalent dérivé d'un alpha-amino-
- 35 acide ou d'un peptide comportant de 2 à 3 résidus

d'acides aminés.

Dans ces dérivés de peptides, on utilise comme groupement chimique capable d'interagir avec l'atome de zinc du site actif des collagénases, le groupe phosphinique PO_2^-CH_2 qui présente un fort pouvoir inhibiteur, tout en conférant au dérivé une bonne stabilité chimique.

En effet, l'utilisation de cette liaison phosphinique rend ces nouveaux dérivés stables, notamment en milieu acide. De plus, ces dérivés sont particulièrement intéressants car, tout en ayant une excellente affinité vis-à-vis des collagénases bactériennes, ils possèdent en outre une meilleure sélectivité que les inhibiteurs connus.

De plus, les dérivés de peptides de l'invention répondant à la formule (I) dans laquelle R^1 et R^7 forment ensemble un radical bivalent dérivé d'un alpha-aminoacide ou d'un peptide, possèdent une stabilité améliorée vis-à-vis de la dégradation possible par des protéases.

En effet, un des problèmes auxquels on doit faire face quand on utilise des peptides dans des milieux physiologiques concerne le fait que ces molécules sont en général très rapidement inactivées par des protéases capables de cliver une liaison peptidique présente dans ces molécules.

Dans la définition des peptides de l'invention, les termes "alpha-aminoacide" se rapportent aux vingt α -aminoacides communément trouvés dans les protéines qui sont également connus sous le nom d'aminoacides standard et à leurs analogues. Les chaînes latérales de ces aminoacides comprennent des groupes alkyle linéaires et ramifiés, hydroxyalkyle, carboxyalkyle, aralkyle, aminoalkyle, carboxamide alkyle, mercapto alkyle, phénylalkyle,

hydroxyphénylalkyle, guanidinoalkyle,
imidazoylealkyle, indolylealkyle, et pyrrolidinyle.

A titre d'exemple d'acides aminés utilisables, on peut citer l'alanine, l'arginine, l'asparagine, l'acide aspartique, la cystéine, la glutamine, l'acide glutamique, la glycine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la norleucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la proline, l'hydroxyproline, la sérine, la thréonine, le tryptophane, la tyrosine, la valine, la nitrophénylalanine, l'homo arginine, la thiazolidine et la déshydroproline.

Les termes "groupe capable de bloquer la terminaison N d'un α -aminoacide" ou "groupe bloquant" incluent tous les groupes bloquants utilisables pour bloquer les fonctions amines d'aminoacides et de peptides, par exemple les groupes t-butoxycarbonyle, benzyloxycarbonyle, cinnamoyle, pivaloyle et N-(9-fluorényl-méthoxycarbonyle).

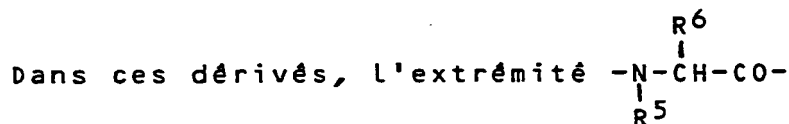
Les métaux utilisables pour R^3 et R^8 sont en particulier des métaux pharmaceutiquement acceptables, par exemple des métaux alcalins tels que le sodium et le lithium.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, R^1 représente un atome d'hydrogène, un groupe capable de bloquer la terminaison N d'un α -aminoacide ou un radical dérivé d'un α -aminoacide ou d'un peptide éventuellement protégé par un groupe bloquant, et R^7 représente OR^8 avec R^8 représentant un atome d'hydrogène, un atome de métal, un groupe alkyle ou un groupe benzyle.

Dans ces dérivés, R^2 est la chaîne latérale d'un α -aminoacide qui peut être par exemple la phénylalanine, et R^4 est dérivé d'un acide aminé

choisi parmi la proline, l'hydroxyproline, la thiazolidine et la dēshydroproline.

On utilise de préférence pour R^4 le dérivé de la proline de formule :



peut correspondre à différents acides aminés.

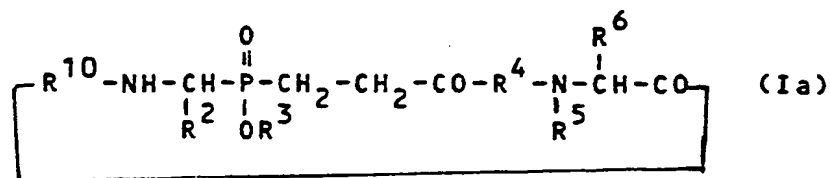
A titre d'exemple, il peut s'agir de la norleucine et dans ce cas, R^5 est un atome d'hydrogène et R^6 est le groupe n-butyle.

Dans ce premier mode de réalisation de l'invention, R^1 peut représenter un groupe bloquant, par exemple le groupe benzyloxycarbonyl, ou correspondre à un résidu d'acide aminé protégé, par exemple à la glycine protégée par un groupe bloquant, ou à un résidu de peptide protégé, par exemple -Pro-Gly protégé par un groupe bloquant. Ce groupe bloquant peut être également le groupe benzyloxycarbonyl.

Lorsque les dérivés de peptides de l'invention sont destinés à être utilisés comme inhibiteurs des collagénases bactériennes, R^3 est de préférence un métal tel que le sodium, et dans R^7 c'est-à-dire OR^8 , R^8 est également de préférence un métal par exemple le sodium.

Selon un second mode de réalisation de l'invention, le dérivé de peptide est un cyclopeptide

répondent par exemple à la formule :



dans laquelle R^{10} représente un radical bivalent dérivé d'un peptide ou d'un alpha-aminoacide.

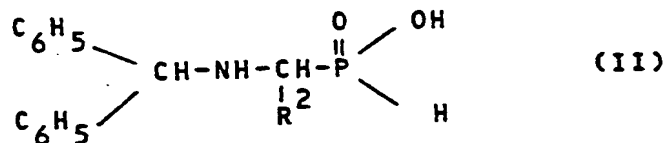
Généralement R^{10} est dérivé d'un peptide et comprend par exemple deux résidus d'acide aminé. Avec un tel R^{10} , on obtient un dérivé cyclique plus résistant à la dégradation par des protéases que les dérivés de formule (I) non cyclique, qui conserve par ailleurs intactes ses propriétés inhibitrices vis-à-vis des collagénases bactériennes.

Dans ce second mode de réalisation de l'invention, R^2 , R^3 , R^4 , R^5 et R^6 représentent avantageusement les mêmes groupes que dans le premier mode de réalisation de l'invention.

Les dérivés de peptides de l'invention peuvent être préparés par des procédés classiques.

Ainsi, les dérivés correspondant au premier mode de réalisation de l'invention dans lesquels R^1 est un groupe bloquant, R^2 , R^3 , R^4 , R^5 et R^6 ont la signification donnée ci-dessus, et R^7 représente OR^8 avec R^8 identique à R^3 , peuvent être préparés par un procédé comprenant les étapes suivantes :

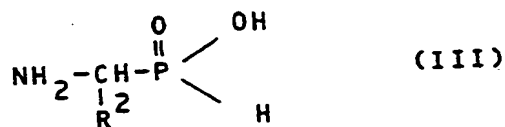
a) faire réagir un aldéhyde de formule R^2-CHO dans laquelle R^2 a la signification donnée ci-dessus avec du diphényl aminohypophosphite pour obtenir un acide diphénylméthylaminoalkylphosphinique de formule :



5

b) faire réagir l'acide diphenylméthylaminoalkylphosphinique de formule (II) avec un hydracide halogéné de formule HX dans laquelle X est un atome d'halogène, pour obtenir un acide aminoalkylphosphinique de formule :

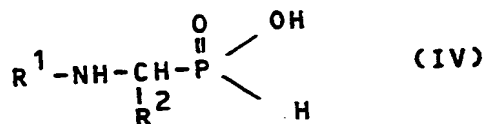
10



15

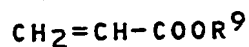
c) protéger la terminaison N de l'acide aminoalkylphosphinique de formule (III) par le groupe bloquant R¹ pour obtenir l'acide aminoalkylphosphinique de formule :

20



25

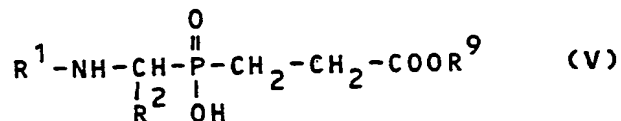
d) faire réagir l'acide de formule (IV) avec un acrylate d'alkyle de formule :



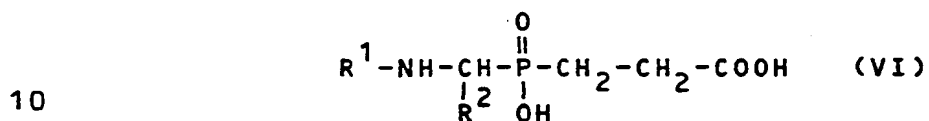
30

dans laquelle R⁹ est un radical alkyle pour obtenir le composé de formule :

35

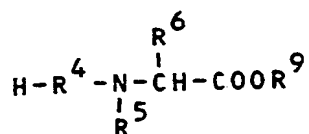


5 e) saponifier le composé de formule (V)
pour obtenir l'acide de formule (VI)



10 f) faire réagir l'acide de formule (VI)
avec un peptide de formule

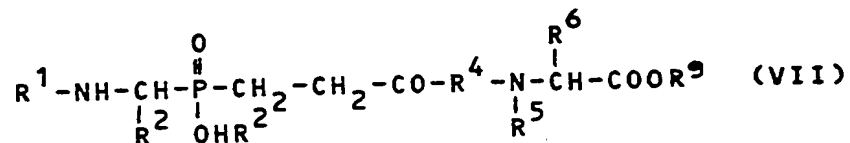
15



20

dans laquelle R⁹ est un radical alkyle pour obtenir
le peptide de formule (VII)

25



30

g) faire réagir le peptide de formule
(VII) avec un halogénure de formule R³X dans laquelle
R³ a la signification donnée ci-dessus et X est
un atome d'halogène pour obtenir le peptide de

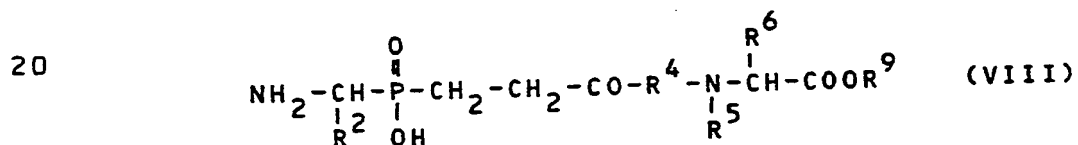
35

formule (I).

Les dérivés de peptides correspondant au premier mode de réalisation de l'invention, c'est-à-dire répondant à la formule (I) dans laquelle
 5 R¹ est un radical dérivé d'un acide aminé ou d'un peptide dont la terminaison N est protégée par un groupe bloquant, R², R³, R⁴, R⁵ et R⁶ ont la signification donnée ci-dessus, et R⁷ représente OR⁸ avec R⁸ identique à R³, peuvent être préparés
 10 par un procédé comprenant les étapes successives suivantes :

a") préparer un peptide de formule (VII) en réalisant les étapes a) à f) du procédé décrit ci-dessus,

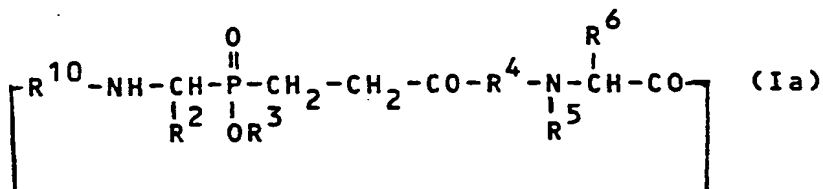
15 b') éliminer le groupe protecteur R¹ du peptide de formule (VII) pour obtenir le peptide de formule :



25 c') faire réagir le peptide de formule (VIII) avec un acide aminé ou un peptide dont la terminaison N est protégée par un groupe bloquant et dont la terminaison C est activée par un groupe nitrophényle, et

30 d') faire réagir le peptide obtenu dans l'étape c') avec un halogénure de formule R³X dans laquelle X est un atome d'halogène.

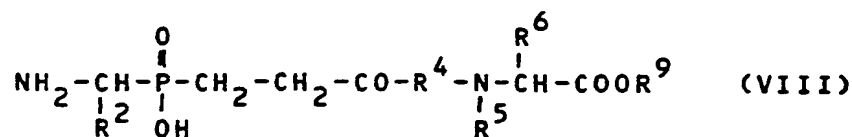
Les dérivés de cyclopeptides correspondant au second mode de réalisation de l'invention et répondant à la formule :



5 dans laquelle R^{10} représente un radical bivalent dérivé d'un peptide ou d'un aminoacide et R^2 , R^3 , R^4 , R^5 et R^6 ont la signification donnée ci-dessus, peut être préparé par un procédé comprenant les étapes successives suivantes :

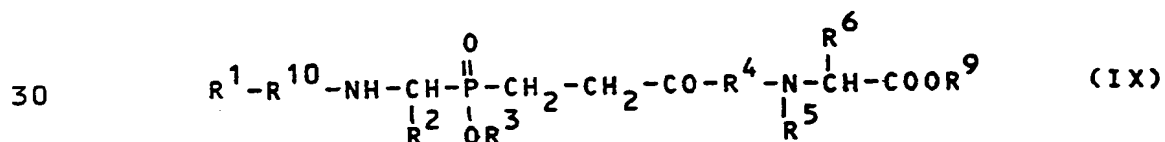
10 a") préparer un peptide de formule (VII) en réalisant les étapes a) à f) du procédé décrit ci-dessus,

15 b") éliminer le groupe protecteur R^1 du peptide de formule (VII) pour obtenir le peptide de formule :



20

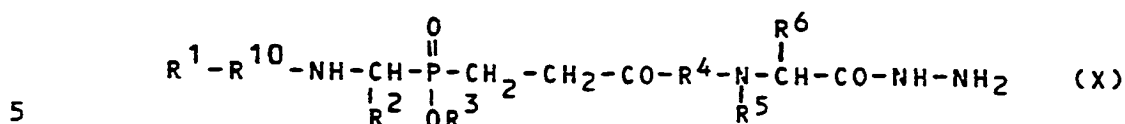
25 c") faire réagir le peptide de formule (VIII) avec un peptide de formule $\text{R}^1-\text{R}^{10}-\text{OR}^{11}$ dans laquelle R^1 est un groupe bloquant la terminaison N du peptide et R^{11} est un groupe nitrophényle, pour obtenir le peptide de formule :



30

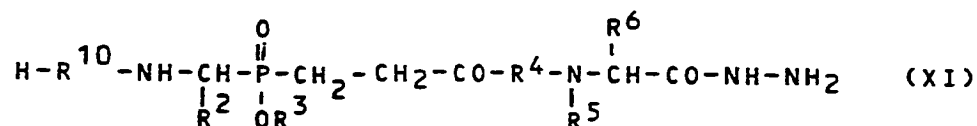
35 d") faire réagir le peptide de formule (IX) avec l'hydrazine pour obtenir l'hydrazide

de formule :



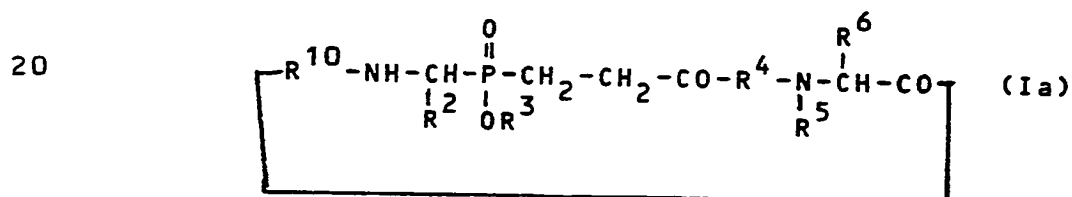
e") déprotéger l'hydrazide de formule (X) pour obtenir l'hydrazide de formule :

10



15

f") cycliser l'hydrazide de formule (XI) pour obtenir le cyclopeptide de formule (Ia)



25 Dans les procédés décrits ci-dessus, les différentes étapes sont réalisées par des techniques classiques et en utilisant les réactifs et les solvants généralement employés dans la chimie des peptides pour réaliser ces types de réactions.

30 Les dérivés de peptides de l'invention peuvent trouver de nombreuses applications en raison de leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis des collagénases bactériennes.

35 Ils peuvent être utilisés en particulier dans des compositions pharmaceutiques destinées au traitement de certaines infections dues à la

présence de bactéries capables d'excréter de la collagénase.

En effet, la présence de ces bactéries peut entraîner une destruction importante du collagène et porter donc atteinte à l'intégrité du tissu conjonctif de l'organisme infecté. C'est le cas en particulier des affections par *Clostridium histolyticum* ou par *Pseudomonas aeruginosa*. On peut les utiliser en particulier pour le traitement des maladies parodontales associées aux microorganismes collagénolytiques qui sont responsables de la destruction du collagène, entrant par exemple dans la composition de la gencive. En effet, bien que les dérivés de peptides de l'invention n'aient pas d'action directe sur les microorganismes collagénolytiques, ils constituent un moyen thérapeutique intéressant dans certaines pathologies (par exemple gangrène, infections dentaires) car ils sont des inhibiteurs puissants et spécifiques des collagénases bactériennes. Dans ces applications pharmaceutiques, on peut aussi utiliser les dérivés de peptides de l'invention pour inhiber d'autres métalloprotéases présentant des spécificités proches de celles des collagénases bactériennes, impliquées dans le métabolisme du collagène.

Aussi, l'invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant une quantité pharmaceutiquement efficace d'un dérivé de peptide de l'invention répondant à la formule (I) donnée ci-dessus dans laquelle R^3 est un atome d'hydrogène ou de métal.

Cette composition peut être sous la forme d'un sel physiologiquement acceptable du dérivé

de peptide, dans un véhicule ou un support physiologiquement acceptable appropriée. Elle peut par exemple être administrée sous la forme de solutions ou de suspensions par injection.

5 Les doses préférées à administrer se situent dans la gamme allant de 1mg/kg/jour à environ 5mg/kg/jour.

Les compositions peuvent être aussi sous la forme de compositions destinées à l'administration orale, telles que des comprimés ou des capsules, obtenus par exemple en combinant les dérivés de peptides de l'invention avec des supports, des excipients et des additifs classiques tels que le carbonate de magnésium, le stéarate de magnésium, 10 le talc, le sucre, le lactose, la pectine, la dextrine, l'amidon, la gélatine, le tragacanth, la méthylcellulose, la carboxyméthylcellulose de sodium, le beurre de cacao, etc. Des diluants, des agents de saveur, des solubilisants, des lubrifiants, 15 des agents de mise en suspension, des liants, des agents de désintégration etc. peuvent être ajoutés aux compositions. Les ingrédients actifs peuvent être aussi encapsulés avec d'autres supports etc.

Les dérivés de peptides de l'invention 25 peuvent également trouver des applications dans d'autres domaines, par exemple pour la protection des peaux dans le domaine de la fabrication du cuir et pour la protection de la gélatine dans différentes activités utilisant la gélatine.

30 En effet, si le substrat naturel des collagénases bactériennes apparaît être prioritairement le collagène natif, on sait que cette protéase peut utiliser comme substrat du collagène sous sa forme dénaturée, c'est-à-dire la gélatine. La

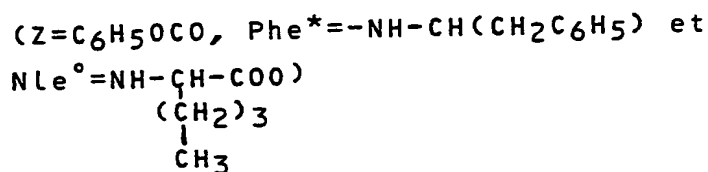
gélatine est utilisée actuellement dans divers contextes et il est intéressant de maintenir l'intégrité parfaite de la gélatine pour ces applications. Ceci peut donc être obtenu en utilisant les dérivés de peptides de l'invention comme inhibiteurs compétitifs des collagénases bactériennes susceptibles de détruire la gélatine.

On peut encore utiliser les dérivés de peptides de l'invention pour isoler de nouvelles protéases à zinc présentant une spécificité proche de celle que possèdent les collagénases bactériennes, notamment au sein des organismes supérieurs. Dans ce cas, on peut utiliser les dérivés de peptides de l'invention comme ligand pour la réalisation de colonnes d'affinité en vue de séparer d'autres protéases à zinc.

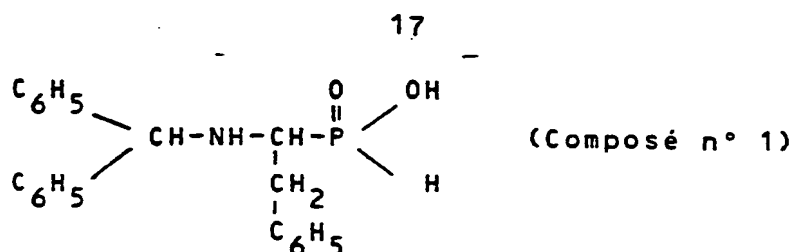
On peut aussi utiliser les dérivés de peptides de l'invention comme moyen pour contrôler l'activité de la collagénase bactérienne, par exemple dans des procédés biotechnologiques basés sur l'utilisation de bactéries collagénolytiques, par exemple pour l'attendrissement de la viande et la digestion de sédiments dans les bassins de sédimentation.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture des exemples suivants donnés bien entendu à titre illustratif et non limitatif.

Exemple 1 : Préparation de Z-D,L-Phe*-PO₂CH₂-CH₂-CO Pro-NLe^o, 2Na⁺. (Composé A).



a) Synthèse de l'acide diphenylméthylamino-1phényl-2éthylphosphinique D,L (1) : (composé n° 1).



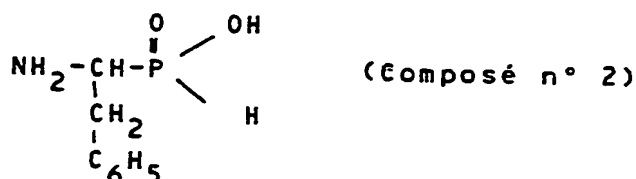
5

Une solution de dioxane (12ml) contenant (12g, 0,1mol) de phénylacétaldéhyde (12g, 0,1mol) est ajoutée doucement à une solution de dioxane (300ml) contenant en suspension du diphénylaminohypophosphite (24,9g, 0,1mol). L'addition de phénylacétaldéhyde est faite à 100°C sous atmosphère d'azote au fur et à mesure de façon à ce que la température ne dépasse pas 100°C. Cette addition se fait durant 3h. L'eau formée au cours de la réaction est éliminée par distillation azéotropique. Après avoir ajouté tout l'aldéhyde, la réaction est laissée sous reflux 15min. Ce mélange est refroidi, puis dilué avec 100ml d'éthanol. Le produit cristallisé est filtré, lavé à l'éthanol, puis à l'éther et séché. On obtient ainsi 12g du composé n°1 (34%) ; (p.f=210°C, Rf(1)=0,81).

20

b) Synthèse de l'acide amino-1phényl-2éthylphosphinique D,L(2) de formule :

25



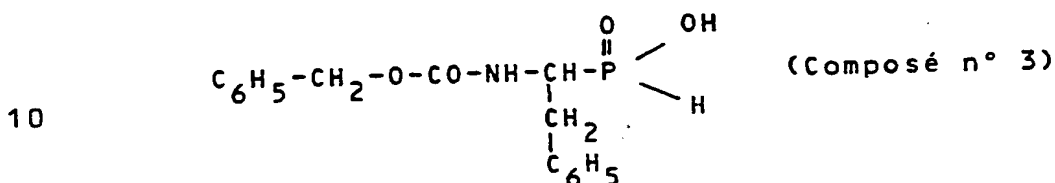
30

Le composé n°1 (3,51g, 10mmol) est chauffé à 100°C pendant 1h dans un mélange HBr/H₂O à 48% (12ml). Ce mélange est évaporé à sec sous vide très poussé, puis le produit est repris dans l'eau. Le bromure de diphénylméthyl est extrait de cette solution par un traitement à l'éther. Après évaporation, le produit est repris dans 30ml d'éthanol. Ce mélange, auquel est ajouté 1ml d'oxyde de propylène, est refroidi à 4°C jusqu'à précipitation complète

35

du produit. Le produit filtré est lavé à l'éthanol, puis à l'éther et séché. Le composé n° 2 attendu (2) est obtenu avec un rendement de 76% (1,42g), $R_f(1)=0,37$, $R_f(2)=0,7$, p.f 226°C.

5 c) Synthèse de l'acide benzyloxycarbonyl-amino-1phényl-2éthyl-phosphinique D,L(3) de formule:

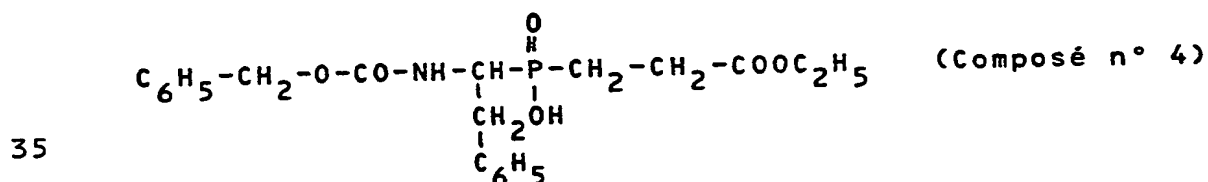


15 Le composé n° 2 (1,1g, 6mmol) est dissous dans 10ml d'eau, puis on ajuste le pH de cette solution à 9,5 à l'aide d'une solution de soude 4N. A ce mélange refroidi dans un bain de glace on ajoute doucement du benzyl chloroformate (1,2ml, 7,5mmol), tout en maintenant le pH de la réaction

20 à 9,5 par additions successives de soude. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 0°C pendant 30min, puis pendant 1h à la température ambiante. Après traitement au diéthyléther, ce mélange est

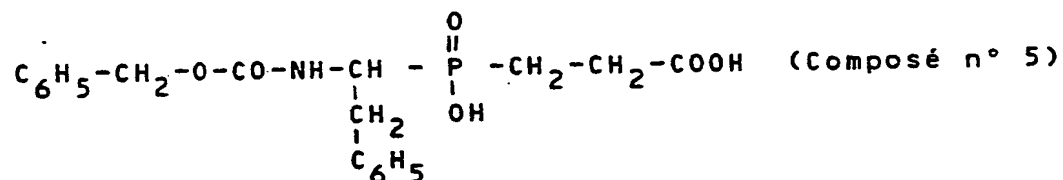
25 refroidi, puis acidifié par addition d'acide chlorohydrique. Le produit qui précipite est filtré, lavé à l'eau froide et séché. Le composé n° 3 attendu est obtenu avec un rendement de 76% (1,5g), $R_f(1)=0,57$, $R_f(2)=0,76$, p.f 110°C.

30 d) Synthèse du D,L (benzyloxycarbonylamino-1'phényl-2')hydroxyphosphinyléthyl-3propionate d'éthyle(4) de formule :



Une suspension du composé n° 3 (1,27g, 4mmol) dans de l'hexaméthylidisilazane (0,968g, 6mmol) est chauffée sous agitation à 110°C pendant 40min sous atmosphère d'argon. Après avoir refroidi ce mélange à 90°C, on ajoute goutte à goutte l'acrylate d'éthyle (0,48g, 4,8mmol). Cette réaction est laissée ensuite pendant 15min à 90°C sous agitation. On ajoute 12ml d'éthanol absolu à ce mélange lorsque sa température atteint 70°C, puis une fois revenu à température ambiante on évapore à sec. Le résidu est dissous dans 10ml de NaHCO₃ à 10%, puis lavé au diéther. La solution aqueuse, une fois refroidie, est acidifiée à pH1,5 avec HCl 1N. Le précipité est filtré, lavé à l'eau froide et séché. Le composé n°4 attendu est obtenu avec un rendement de 84% (1,4g). Rf(1)=0,52, Rf(3)=0,8.

e) Synthèse de l'acide benzyloxycarbonylamino 1'-phényl 2'hydroxyphosphinyléthyl-3 propionique de formule :



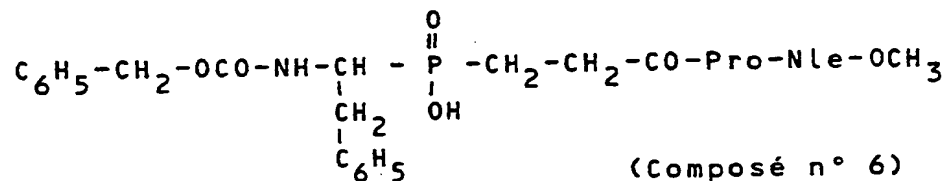
Le composé n°4 (1,26g, 3mmol) est dissous dans 6,5ml de KOH 1N et laissé sous agitation à température ambiante pendant 45min. Ce mélange est ensuite acidifié à pH 1,5 avec HCl 1N. Le précipité est extrait avec de l'éthylacétate, puis cette phase est lavée avec une solution aqueuse saturée avec NaCl, séchée avec du sulfate de sodium et concentrée en un faible volume. Après une nuit à 4°C, le précipité est filtré, lavé avec un peu

d'éthylacétate et séché. Le composé n° 5 attendu est obtenu avec un rendement de 88% (1g).

$$Rf(1)=0,51, \quad Rf(2)=0,93, \quad Rf(3)=0,55, \quad Rf(5)=0,41.$$

f) Synthèse du peptide de formule :

5 Z-D, L⁺Phe*PO(OH)-CH₂-CH₂-CO-Pro-NLe^o-OCH₃



10

A une solution froide à 4°C du composé n° 5 dissous dans du tétrahydrofurane (12ml), on ajoute du 1-1-carbonyldiimidazole (1,78g, 11mmol). Après 45min sous agitation à température ambiante on ajoute à ce mélange le peptide Pro-Nle-OCH₃ (5,5mmol) dilué dans du tétrahydrofurane (5ml). Le mélange, après 24h sous agitation, est évaporé à sec. Ce résidu est dissous dans 20ml de KOH 0,27N (5,5mmol), et cette phase est immédiatement lavée avec du diéther, acidifiée à pH 1,5 avec HCl 1N. Le produit qui précipite est repris dans l'acétate d'éthyle, et cette phase est lavée avec de l'eau, séchée avec du sulfate de sodium et concentrée à sec. Ce résidu est dissous dans un faible volume de chloroforme, puis précipité en ajoutant de l'éther de pétrole. Le composé n° 6 final, après filtration, lavage et séchage, est obtenu avec un rendement de 89% (3g).

30 $Rf(5)=0,6, Rf(6)=0,33.$

g) Synthèse du peptide de formule

$$\text{Z-D,L-Phe}^*-\text{PO}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{Pro-Nle}^0, 2\text{Na}^+ \text{ (Composé A).}$$

Le composé n°6 (0,15g, 0,19mmol) est dissous dans l'éthanol 10% (15ml), puis on ajoute du KOH 2N(0,475ml) sous agitation 3h à température ambiante. La phase aqueuse est acidifiée à pH 1,5 avec HCl 1N. Le précipité est repris dans de l'éthylacétate et la phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée avec du sulfate de sodium et concentrée à sec. Le résidu est dilué dans une solution aqueuse contenant du NaHCO₃ (0,38mmol), puis lyophilisé. Le produit attendu est obtenu avec un rendement de 93%.

Rf(1)=0,27, Rf(2)=0,85, Rf(8)=0,57.

¹H NMR (H₂O): CH_ε Nle 0,94; CH_{δ,γ} Nle 1,37 (m, 4); CH_β Nle 1,84 (m, 1); CH_β Nle 1,73 (m, 1); CH_α Nle 4,18 (m, 1); NH Nle 8,08 (d,1); CH_γ Pro 2,02 (m, 2); CH_β Pro 2,02 (m, 1); CH_β Pro 2,28 (m, 1); CH_δ Pro 3,63 (m, 1); CH_δ Pro 3,48 (m, 1); CH_α Pro 4,41 (q, 1); P-CH₂-CH₂ 2,57 (m,2); P-CH₂-CH₂ 1,88 (m,2); CH_β Phe 2,73 (m,1); CH_β Phe 3,26 (m,1); CH_α Phe 3,96 (m,1); NHPhe 7,26; (d,1); Z-CH₂- 5 (m,2); Ar 7.35 (m, 10).

³¹P NMR (H₂O): 43,83

Exemple 2 : Préparation du peptide

Z-Pro-Phe*-PO(OH)-CH₂-CH₂-CO-Pro-Nle^o2Na⁺ (composé B)

(Z=C₆H₅OCO- et Phe*=NH-CH(CH₂C₆H₅)-)

Le groupement protecteur Z du composé n°6 est éliminé par hydrogénolyse catalytique classique. Le produit obtenu est couplé au Z-Pro-ONph (nitrophényl ester) commercial dans le diméthylformamide. Le produit est saponifié, puis traité dans les mêmes conditions que celles décrites pour l'obtention du composé A.

^1H NMR (H_2O): CH_ϵ Nle 0,89; $\text{CH}_{\delta,\gamma}$ Nle 1,35 (m, 4); CH_β Nle 1,84 (m, 1); CH_β Nle 1,73(m, 1); CH_α Nle 4,12 (m, 1); NH Nle 7,96 (d,1); CH_γ Pro 2,02(m, 2); CH_β Pro 1,98 (m, 1); CH_β Pro 2,25 (m, 1); CH_δ Pro 3,63 (m, 1); CH_δ Pro 3,52(m, 1) ; CH_α Pro 4,28 (q, 1); P- CH_2 - CH_2 2,63 (m,2); P- CH_2 - CH_2 1,70 (m,2); CH_β Phe 2,73 (m,1); CH_β Phe 3,31 (m,1); CH_α Phe 4,42 (m,1); NH Phe 8,16 (d,1); CH_γ Pro 1,55 (m, 2); CH_β Pro 1,72 (m, 1); CH_β Pro 2,15 (m, 1); CH_δ Pro 3,42 (m, 1) ; CH_α Pro 4,32 (q, 1); Z- CH_2 - 5 (m,2); Ar 7,35-7,45 (m, 10).

^{31}P NMR (H_2O): 43,2

10

Exemple 3 : Préparation du peptide

Z-Gly-Pro-Phe*- $\text{PO}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{Pro}-\text{Nle}^\circ 2\text{Na}^+$ (composé C)

(Z= $\text{C}_6\text{H}_5\text{OCO}$ et Phe*= $-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)-$)

15

La synthèse de ce peptide est réalisée par couplage du Z-Gly-Pro-ONph au composé n°6, ayant subi au préalable une hydrogénolyse catalytique classique, puis traité dans les mêmes conditions que celles décrites pour l'obtention du composé

20

ci-dessus A.

^1H NMR (H_2O): CH_ϵ Nle 0.89; $\text{CH}_{\delta,\gamma}$ Nle 1,35 (m, 4); CH_β Nle 1,84 (m, 1); CH_β Nle 1,73(m, 1); CH_α Nle 4,12 (m, 1); NH Nle 7,96 (d,1); CH_γ Pro 2,02(m, 2); CH_β Pro 1,98 (m, 1); CH_β Pro 2,25 (m, 1); CH_δ Pro 3,63 (m, 1); CH_δ Pro 3,52(m, 1) ; CH_α Pro 4,28 (q, 1); P- CH_2 - CH_2 2,63 (m,2); P- CH_2 - CH_2 1,70 (m,2); CH_α Gly 3,65 (d,1); CH_α Gly 3.45 (d,1); CH_β Phe 2,73 (m,1); CH_β Phe 3,31 (m,1); CH_α Phe 4,37(m,1); NH Phe 8,2 (d,1); CH_γ Pro 1,55 (m, 2); CH_β Pro 1,70 (m, 1); CH_β Pro 2,15 (m, 1); CH_δ Pro 3,40 (m, 1) ; CH_α Pro 4,29(q, 1); Z- CH_2 - 5 (m,2); Ar 7,35-7.45 (m, 10).

30

^{31}P NMR (H_2O): 43,35

Exemple 4 : Préparation du cyclopeptide

Gly-Pro-Phe*- $\text{PO}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{Pro}-\text{Nle}^\circ, \text{Na}^+$

(composé D)

35

La synthèse de ce produit est réalisée

à partir du composé Z-Gly-Pro-Phe*-PO(OH)-CH₂-CH₂-CO-Pro-Nle^o-OCH₃ obtenu dans l'exemple 3 au cours de la synthèse du composé C. On prépare l'hydrazide de ce composé par traitement à l'hydrazine dans le méthanol, puis le groupement protecteur Z est éliminé par hydrogénation catalytique classique. La cyclisation est alors réalisée selon la méthode de Bodanzsky M. et Henes G.B. (1975), Bioorg. Chem. Vol. 4, p. 212-218.

10 ¹H NMR (H₂O): CH_ε Nle 0,92; CH_δ Nle 1,28 (m, 2); CH_γ Nle 1,28 (m, 2); CH_β Nle 1,95 (m, 1); CH_β Nle 1,67 (m, 1); CH_α Nle 4,5 (m, 1); NH Nle 8,31 (d, 1); CH_γ Pro 2,11 (m, 2); CH_β Pro 2,02 (m, 1); CH_β Pro 2,38 (m, 1); CH_δ Pro 3,63 (m, 1); CH_δ Pro 3,82 (m, 1); CH_α Pro 4,38 (q, 1); P-CH₂-CH₂ 2,68 (m, 2); P-CH₂-CH₂ 1,62 (m, 1); P-CH₂-CH₂ 2,29 (m, 1); CH_β Phe 2,78 (m, 1); CH_β Phe 3,25 (m, 1); CH_α Phe 4,27 (m, 1); NH Phe 8,33 (d, 1); CH_γ Pro 1,88 (m, 2); CH_β Pro 1,18 (m, 1); CH_β Pro 2,06 (m, 1); CH_δ Pro 3,58 (m, 1); CH_δ Pro 3,41 (m, 1); CH_α Pro 4,28 (q, 1); Ar 7,35-7,45 (m, 10).
 15 ³¹P NMR (H₂O): 43.83

Exemple 5 : Détermination de l'activité des inhibiteurs.

Les activités des différents composés A, B, C et D ont été déterminées d'une part en mesurant la constante de vitesse d'association des inhibiteurs à la collagénase par la méthode Morrison, J., & Walsh, C.T. (1987) Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. appliquée dans le cas où les inhibiteurs sont du type slow binding ; puis d'autre part par la mesure des constantes de vitesse de dissociation des inhibiteurs du complexe enzyme-inhibiteur. Dans ce cas, après avoir laissé préincuber la collagénase en présence d'un excès d'inhibiteur, on purifie le complexe enzyme-inhibiteur ainsi formé par gel filtration. Puis la solution contenant le complexe purifié est diluée par un

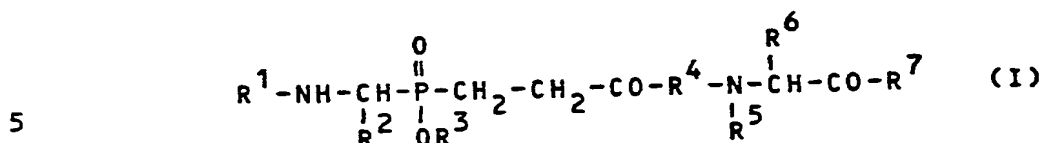
facteur 10000 dans un tampon de référence et l'on mesure alors en fonction du temps le retour de l'activité de la collagénase, qui traduit la dissociation de l'inhibiteur du complexe enzyme-inhibiteur. Les constantes d'inhibition reportées dans le tableau qui suit correspondent au rapport des constantes de vitesse de dissociation K_{off} et de vitesse d'association K_{on} ainsi mesurées. Dans toutes les expériences de mesures d'activité, nous avons utilisé comme substrat synthétique le Fa-Leu-Gly-Pro-Ala dans un tampon Tricine pH7. La source de collagénase bactérienne utilisée provient de la souche *Empedobacterium collagenolyticum*.

TABLEAU

Composé	Formule	Constantes d'inhibition K_i (nM)
A	$Z, D, L-Phe^* - \overset{\overset{O}{\parallel}}{\underset{\underset{O}{ }}{P}} - \overset{\overset{Gly}{\curvearrowright}}{CH_2} - CH_2 - CO - Pro - Nle^{\circ}, 2Na^+$	12
B	$Z-Pro-D, L-Phe^* - \overset{\overset{O}{\parallel}}{\underset{\underset{O}{ }}{P}} - CH_2 - CH_2 - CO - Pro - Nle^{\circ}, 2Na^+$	80
C	$Z-Gly-Pro-D, L-Phe^* - \overset{\overset{O}{\parallel}}{\underset{\underset{O}{ }}{P}} - CH_2 - CH_2 - CO - Pro - Nle^{\circ}, 2Na^+$	0,4
D	$Gly-Pro-D, L-Phe^* - \overset{\overset{O}{\parallel}}{\underset{\underset{O}{ }}{P}} - CH_2 - CH_2 - CO - Pro - Nle^{\circ}, Na^+$	8

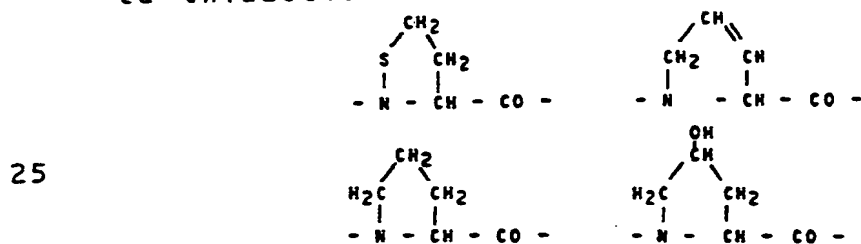
REVENDICATIONS

1. Dérivé de peptide répondant à la formule



dans laquelle

- 10 - R¹ représente un atome d'hydrogène, un groupe capable de bloquer la terminaison N d'un alpha-aminoacide, ou un radical dérivé d'un alpha-aminoacide ou d'un peptide rattaché à NH par sa terminaison CO et comportant sur sa terminaison N un atome d'hydrogène ou un groupe capable de bloquer la
- 15 terminaison N d'un alpha-aminoacide,
- R² est la chaîne latérale d'un alpha-aminoacide,
- R³ est un atome d'hydrogène, un atome de métal, un groupe alkyle en C₁ à C₅ ou un groupe benzyle,
- R⁴ est un radical bivalent dérivé d'un alpha-aminoacide choisi parmi la proline, l'hydroxyproline,
- 20 la thiazolidine et la déshydroproline, de formule :



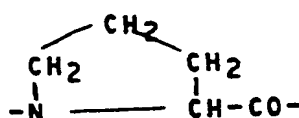
relié à CO par son atome d'azote,

- R⁵ est un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle en C₁ à C₄,
- 30 - R⁶ est un groupe alkyle en C₁ à C₅ ou la chaîne latérale d'un alpha-aminoacide, et
- R⁷ représente OR⁸ avec R⁸ représentant un atome

d'hydrogène, un atome de métal, un groupe alkyle en C₁ à C₅ ou un groupe benzyle, ou dans laquelle soit R¹ et R⁷, soit R¹ et R⁶ forment ensemble un radical bivalent dérivé d'un
 5 alpha-aminoacide ou d'un peptide comportant de 2 à 3 résidus d'acide aminé.

2. Dérivé de peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que R⁴ représente le radical de formule :

10



3. Dérivé de peptide selon l'une quelconque
 15 des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que R⁵ est un atome d'hydrogène et R⁶ est le groupe n-butyle.

4. Dérivé de peptide selon l'une quelconque
 20 des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que R² représente le radical phénylméthyle.

5. Dérivé de peptide selon l'une quelconque
 des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que R¹ représente un groupe capable de bloquer la terminaison N d'un alpha-aminoacide.

25 6. Dérivé selon la revendication 5, caractérisé en ce que R¹ est le groupe benzyloxycarbonyle.

7. Dérivé de peptide selon l'une quelconque
 des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que R¹ représente un radical dérivé de la proline comportant un groupe capable de bloquer sa terminaison N.
 30

8. Dérivé de peptide selon l'une quelconque
 des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que R¹ représente le radical dérivé du peptide Pro-

35

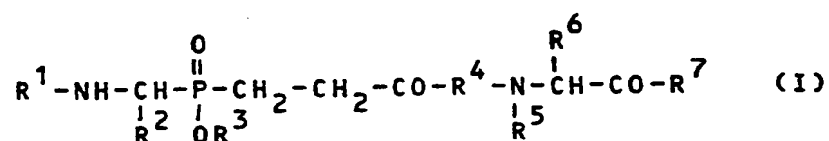
Gly protégé sur la terminaison N de Gly par un groupe bloquant.

9. Dérivé de peptide selon la revendication 8, caractérisé en ce que le groupe bloquant est le groupe benzyloxycarbonyle.

10. Dérivé de peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que R⁷ représente OR⁸ avec R⁸ représentant un atome de sodium et R³ représente un atome de sodium.

11. Dérivé de peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que R¹ et R⁷ forment ensemble le radical bivalent Pro-gly.

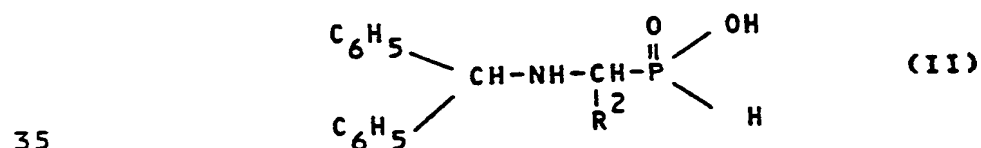
12. Procédé de préparation d'un dérivé de peptide répondant à la formule :



20

dans laquelle R¹ est un groupe capable de bloquer la terminaison N d'un alpha-aminoacide, R², R³, R⁴, R⁵ et R⁶ ont la signification donnée dans la revendication 1, et R⁷ représente OR⁸ avec R⁸ identique à R³, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) faire réagir un aldéhyde de formule R²-CHO dans laquelle R² a la signification donnée ci-dessus avec du diphenyl aminohypophosphite pour obtenir un acide diphenylméthylaminoalkylphosphinique de formule :

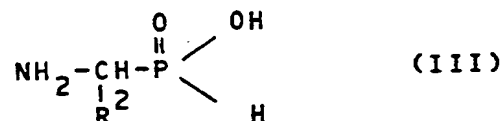


35

b) faire réagir l'acide diphenylméthylami-

noalkylphosphinique de formule (II) avec un hydracide halogéné de formule HX dans laquelle X est un atome d'halogène, pour obtenir un acide aminoalkylphosphinique de formule :

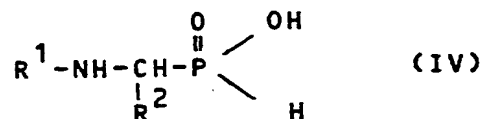
5



10

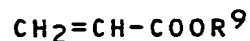
c) protéger la terminaison N de l'acide aminoalkylphosphinique de formule (III) par le groupe bloquant R¹ pour obtenir l'acide aminoalkylphosphinique de formule :

15



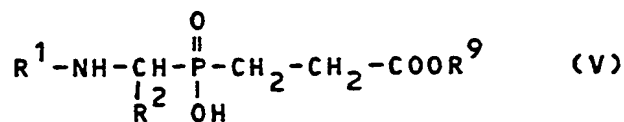
20

d) faire réagir l'acide de formule (IV) avec un acrylate d'alkyle de formule :



dans laquelle R⁹ est un radical alkyle pour obtenir le composé de formule :

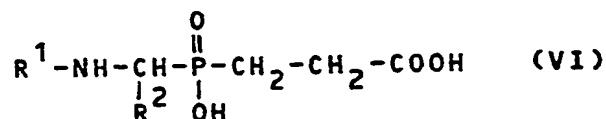
25



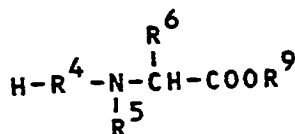
30

e) saponifier le composé de formule (V) pour obtenir l'acide de formule (VI)

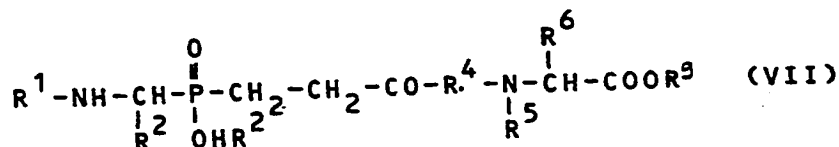
35



f) faire réagir l'acide de formule (VI) avec un peptide de formule

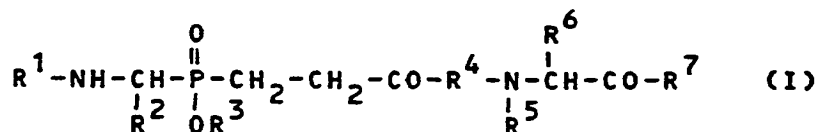


dans laquelle R^9 est un radical alkyle pour obtenir le peptide de formule (VII)



g) faire réagir le peptide de formule (VII) avec un halogénure de formule R^3X dans laquelle R^3 a la signification donnée ci-dessus et X est un atome d'halogène pour obtenir le peptide de formule (I).

13. Procédé de préparation d'un dérivé de peptide répondant à la formule :

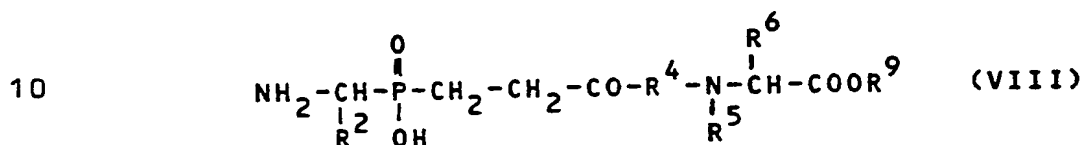


dans laquelle R^1 est un radical dérivé d'un acide aminé ou d'un peptide dont la terminaison N est protégée par un groupe bloquant, R^2 , R^3 , R^4 , R^5 et R^6 ont la signification donnée dans la revendication 1, et R^7 représente OR^8 avec R^8 identique à R^3 , caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivant-

tes :

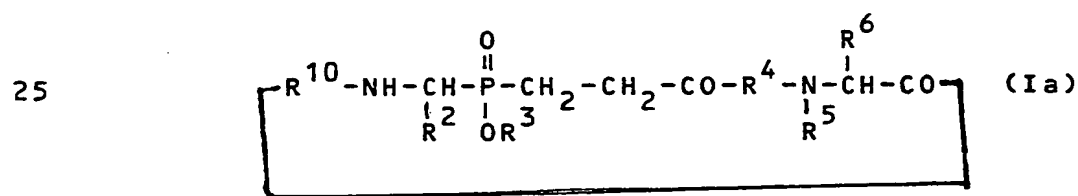
a') préparer un peptide de formule (VII) en réalisant les étapes a) à f) du procédé de la revendication 12,

5 b') éliminer le groupe protecteur R^1 du peptide de formule (VII) pour obtenir le peptide de formule :



15 c') faire réagir le peptide de formule (VIII) avec un acide aminé ou un peptide dont la terminaison N est protégée par un groupe bloquant et dont la terminaison C est activée par un groupe nitro-phényle, d') faire réagir le peptide obtenu dans l'étape c') avec un halogénure de formule R^3X dans
20 laquelle X est un atome d'halogène.

14. Procédé de préparation d'un dérivé de cyclopeptide répondant à la formule :

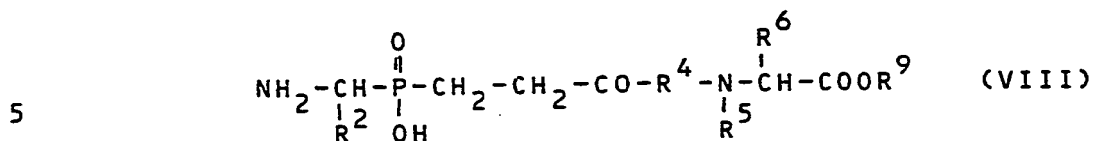


30 dans laquelle R^{10} représente un radical bivalent dérivé d'un aminoacide ou d'un peptide, caractérisé en ce qu'il consiste :

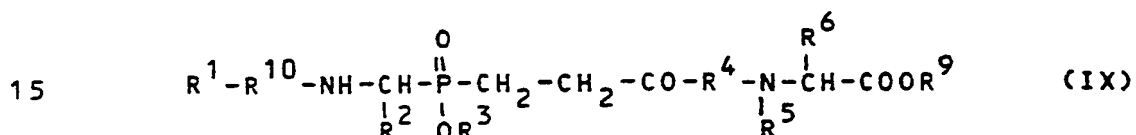
a'') préparer un peptide de formule (VII) en réalisant les étapes a) à f) du procédé de la revendication 12,

35 b'') éliminer le groupe protecteur R^1

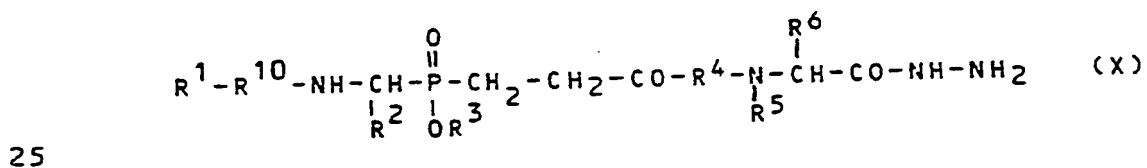
du peptide de formule (VII) pour obtenir le peptide de formule :



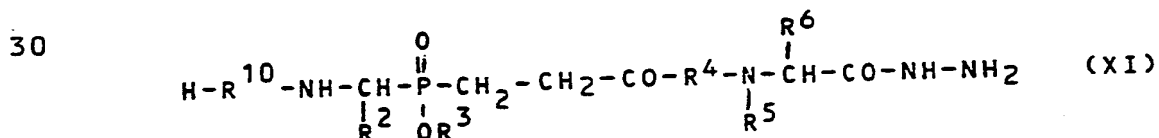
c") faire réagir le peptide de formule (VIII) avec un peptide de formule $\text{R}^1-\text{R}^{10}-\text{OR}^{11}$ dans laquelle R^1 est un groupe bloquant la terminaison N du peptide et R^{11} est groupe nitrophényle, pour obtenir le peptide de formule :



d") faire réagir le peptide de formule (IX) avec l'hydrazine pour obtenir l'hydrazide de formule :

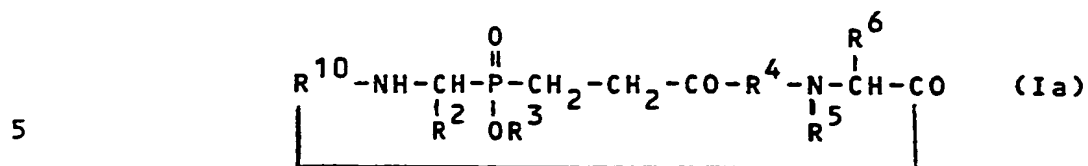


e") déprotéger l'hydrazide de formule (X) pour obtenir l'hydrazide de formule :



f") cycliser l'hydrazide de formule (XI)

pour obtenir le cyclopeptide de formule :



15. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité pharmaceutiquement efficace d'un dérivé de peptide selon l'une
 10 quelconque des revendications 1 à 11 avec R³ représentant un atome d'hydrogène ou de métal.

15

20

25

30

35

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9105403
FA 459870

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	EP-A-0 276 436 (HOFFMAN-LA ROCHE) 3 Août 1988 * le document en entier *	1-15
D,A	BIOCHEMISTRY. vol. 22, 1983, EASTON, PA US pages 4556 - 4561; R.E. GALARDY ET AL: 'INHIBITION OF COLLAGENASE FROM CLOSTRIDIUM HISTOLITICUM BY PHOSPHORIC AND PHOSPHONIC AMIDES' * le document en entier *	1-15
D,A	BIOCHEMISTRY. vol. 27, 1988, EASTON, PA US pages 4299 - 4304; K.A. MOOKHTIAR ET AL: 'KETONE-SUBSTRATE ANALOGUES OF CL. HISTOLITICUM COLLAGENASES; TIGHT-BINDING TRANSITION-STATE ANALOGUE INHIBITORS.' * le document en entier *	1-15
A	BIOCHEMISTRY. vol. 28, 1989, EASTON, PA US pages 4948 - 4951; D. GROBELNY ET AL: 'BIINDING ENERGETICS OF PHOSPHORUS-CONTAINING INHIBITORS OF THERMOLYSIN' * le document en entier *	1-15
A	EP-A-0 058 427 (MERCK AND CO) 25 Août 1982 * le document en entier *	1-15
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
16 DECEMBRE 1991		GOENENDIJK M. S. M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		